

Розроблені методи синтезу кон'югатів мікотоксину Т-2 з протеїнами – бичачий сироватковий альбумін, овальбумін, гемоціанін, желатина для одержання антигенів і подальшої імунізації тварин з метою отримання специфічних антитіл. Встановлено, що кон'югат Т-2 токсин – желатина розчинний у воді і може бути використаний в імунохімічних реакціях. Інші кон'югати Т-2 токсину нерозчинні у воді і придатні тільки для імунізації тварин

Ключові слова: Т-2 токсин, кон'югати, антитіла, бичачий сироватковий альбумін, овальбумін, гемоціанін, желатина, тонкошарова хроматографія

Разработаны методы синтеза конъюгатов микотоксина Т-2 с протеинами – бычий сывороточный альбумин, овальбумин, гемоцианин, желатина для получения антигенов и последующей иммунизации животных с целью получения специфических антител. Установлено, что конъюгат Т-2 токсин – желатина растворим в воде и может быть использован в иммунохимических реакциях. Другие конъюгаты Т-2 токсина нерастворимы в воде и пригодны только для иммунизации животных

Ключевые слова: Т-2 токсин, конъюгаты, антитела, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, гемоцианин, желатина, тонкослойная хроматография

УДК 543.2:602.1:615.918

DOI: 10.15587/1729-4061.2015.51055

РОЗРОБКА СИНТЕЗУ КОН'ЮГАТИВ Т-2 ТОКСИНУ З ПРОТЕЇНАМИ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ІМУНОЧУТЛИВИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

О. С. Гойстер

Кандидат біологічних наук, провідний інженер

Відділ молекулярної біології

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна

вул. Леонтовича, 9, м. Київ, Україна, 01030

E-mail: gojsterO@ukr.net

В. Є. Кривенчук

Доктор фармацевтичних наук,

провідний науковий співробітник

Відділ гігієни полімерів і токсичних відходів

ДП «Науковий токсикологічний центр

ім. Л. І. Медведя МОЗ України»

вул. Героїв Оборони, 6, м. Київ, Україна, 03680

Г. О. Хмельницький

Доктор ветеринарних наук,

професор, академік НААН України

Кафедра фармакології і токсикології

Національний університет біоресурсів та

природокористування НААН України,

вул. Героїв оборони, 15, м. Київ, Україна, 04034

1. Вступ

На сьогодні Т-2 токсин, та інші мікотоксини, ідентифікують як агенти біологічної війни (BWAs) [1]. Вони володіють не лише сильною дерматонекротичною дією, але й вибірково впливають на органи кровотворення, порушують проникність та цілісність клітинних мембран, обмін протеїнів та нуклеїнових кислот, знижують згортання крові. Для токсикозу, викликаного Т-2 токсином, характерними є виразки та некротичні ураження в ротовій порожнині, в кутках рота, язика і на слизовій шлунково-кишкового тракту [2, 3].

В Україні, як і у всьому світі, на сьогодні немає чітко відпрацьованої уніфікованої системи контролю над вмістом мікотоксинів, тому розробка стандартів та тест-систем по їх визначенню, які б стали єдиними та узагальнюючими, є надзвичайно актуальною.

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

Повністю виключити наявність Т-2 токсину в кормовій та в харчовій продукції неможливо, тому завдання контролюючих його якості служб – виявити наявність токсину і порівняти знайдену кількість з нормами гранично допустимого вмісту.

Згідно наказу Міністерства аграрної політики та продовольства України [4], державні служби ветеринарно-санітарного контролю здійснюють визначення вмісту Т-2 токсину у кормах методом тонкошарової хроматографії (ТШХ, TLC). Слід відмітити, що цей метод напівкількісного визначення Т-2 токсину ґрунтується на тонкошаровій хроматографії екстракту досліджуваного зразка корму та подальшому біоавтографічному проявленню хроматограми за допомогою штаму мікроорганізму (*Candida pseudotropicalis* штам 44 пк, Інститут птахівництва УААН). Чутливість методу – 10 мкг/кг корму; тривалість лабораторних досліджень – 14–16 годин [5].

На початку 80-х років вперше були отримані специфічні антитіла при імунізації кролів кон'югатом Т-2 токсину з протеїном і, таким чином, започатковані дослідження аналітичних можливостей імунохімічних методів (ІФА, ELISA) [6]. Розвиток цього напрямку продовжується і зараз як через пошук шляхів отримання антитіл різних типів, так і через створення різних методичних схем виконання ІФА, які дозволяють визначати вміст Т-2 токсину в розчинах з межею виявлення 10–30 нг/мл [7, 8].

Сучасні українські випробувальні лабораторії, широко використовуючи ІФА, залежать від поставок стандартів і подібних тест-систем із-за кордону, зокрема, Ridascreen (компанія R-Biopharm, Германия) та Veratox (Neogen, США). Вартість дослідження одного зразка корму на вміст у ньому Т-2 токсину за допомогою тест-системи Ridascreen®, згідно вищезгаданого наказу, становила близько 1000 грн. Варто зазначити, що кожна з фірм при виробництві тест-наборів застосовує власні розробки, тому їхні методики проведення аналізу відрізняються.

Недавно започаткована у Харківському національному науковому центрі «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини» розробка по виготовленню компонентів для вітчизняної тест-системи ІФА для визначення Т-2 токсину дозволяє отримати поліклональні антитіла з титром 1:8 [9]. Розроблений авторами статті імунобіосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР), при використанні поліклональних антитіл з титром 1:5000, дозволяє визначати Т-2 токсин в конкурентному режимі аналізу з межею виявлення 1 нг/мл [10]. При загальній простоті вимірювань час, витрачений на один аналіз, складає 15 хвилин (за умови попередньої підготовки поверхні чіпа, включаючи попередню іммобілізацію селективних структур), тоді як при ІФА – від 1 до 3 год.

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – розробити детальну методику синтезу імуногенних кон'югатів Т-2 токсину з протеїнами-носіями, які забезпечили б отримання поліклональної антисироватки, специфічної до цього токсину, для розробки вітчизняних тест-систем імуносенсорного контролю мікотоксину у кормах та в продуктах харчування.

Для досягнення поставленої мети треба вирішити такі задачі:

- модифікувати Т-2 токсин бурштиновим ангідридом;
- синтезувати кон'югати Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном, гемоціаніном, желатиною;
- підтвердити наявність кон'югатів методом тонкошарової хроматографії.

4. Матеріали і методи дослідження активованого Т-2 токсину з бурштиновим ангідридом та кон'югатів Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном, гемоціаніном та желатиною

Для виконання роботи використовували кристалічний Т-2 токсин (3-hydroxy-4,15-diacetoxy-8-[3-methyl-

butyryloxy]-12,13-epoxy-9-trichothecene), отриманий в Інституті тваринництва НААН України.

Для синтезу активованого Т-2 токсину з бурштиновим ангідридом та кон'югатів Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном, гемоціаніном та желатиною використані наступні реактиви: бичачий сироватковий альбумін (БСА), овальбумін (ОВ), гемоціанін (ГЦ) компанії Sigma-Aldrich (США); желатина (ЖЛ), водорозчинний карбодіїмід 1-циклогексил-3-(2-N-метилморфоліноетил)карбодіїмід-р-толуолсульфонат, піридин, сірчана кислота, хлороформ, метанол, які мали аналітичну марку хч (Реахім, Україна). Використали пластинки для тонкошарової хроматографії “Сорбфіл” – російського виробництва.

Вибір методики отримання кон'югатів Т-2 токсину з протеїнами-носіями зумовлений тим, що авторам методики [6] вдалося отримати антитіла, які мають найбільшу зв'язуючу здатність до Т-2 токсину, меншу здатність до НТ-2-токсину і найменшу до Т-2 тріолу. Перехресна реакція антитіл з неосоланіолом, Т-2 тетраолом і 8-ацетилнеосоланіолом була дуже слабкою. Діацетоксискірпенол, тріхoderмін, веррукарин по суті не мали перехресної реакції з антитілами сироватки. Варто також відмітити, що вищезазначену методику синтезу кон'югатів Т-2 токсину з протеїнами вже випробовували [7]. Було показано, що перехресна реактивність по відношенню до НТ-2 токсину складає лише 3 %. Така суттєва різниця в розпізнаванні Т-2 токсину і НТ-2, молекули яких є еквівалентними і відрізняються лише замісником при С₄, розташованим поруч з місцем прикріплення гаптену до протеїну, свідчить про високу специфічність отриманих імунореагентів і про можливість вибіркового визначення Т-2 токсину в природних об'єктах, які містять його гомологи.

5. Результати дослідження активованого Т-2 токсину з бурштиновим ангідридом та кон'югатів Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном, гемоціаніном та желатиною

У зв'язку з тим, що Т-2 токсин (М.м.=466) не володіє імуногенними властивостями, його необхідно було кон'югувати з протеїновими носіями. В літературі є опубліковані дані щодо синтезу кон'югату Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном [6, 11], однак опис методик в них схематичний, без детального викладу технології синтезу, відсутні характеристики фізико-хімічних властивостей одержаних продуктів. Тому детальний синтез довелося відпрацьовувати в процесі роботи.

5. 1. Модифікація Т-2 токсину бурштиновим ангідридом

Схема синтезу антигену наступна: в структурі Т-2 токсину є вільна гідроксильна група, яка є недостатньо реакційно здатною, щоб з її допомогою з'єднати мікотоксин з протеїном. Тому Т-2 токсин необхідно було модифікувати, тобто ввести в його структуру реакційноздатну групу, за допомогою якої Т-2 токсин міг би ковалентно з'єднатися з протеїновою молекулою. Згідно з даними літератури [6, 12], для одержання модифікованого Т-2 токсину (гаптену) його піддають взаємодії з бурштиновим ангідридом. При цьому ангідрид бурштинової кислоти реагує з гідроксильною

групою Т-2 токсину з утворенням складного ефіру, а друга карбоксильна група залишається вільною і може бути використана для приєднання модифікованого Т-2 токсину до молекули протеїну (рис. 1).

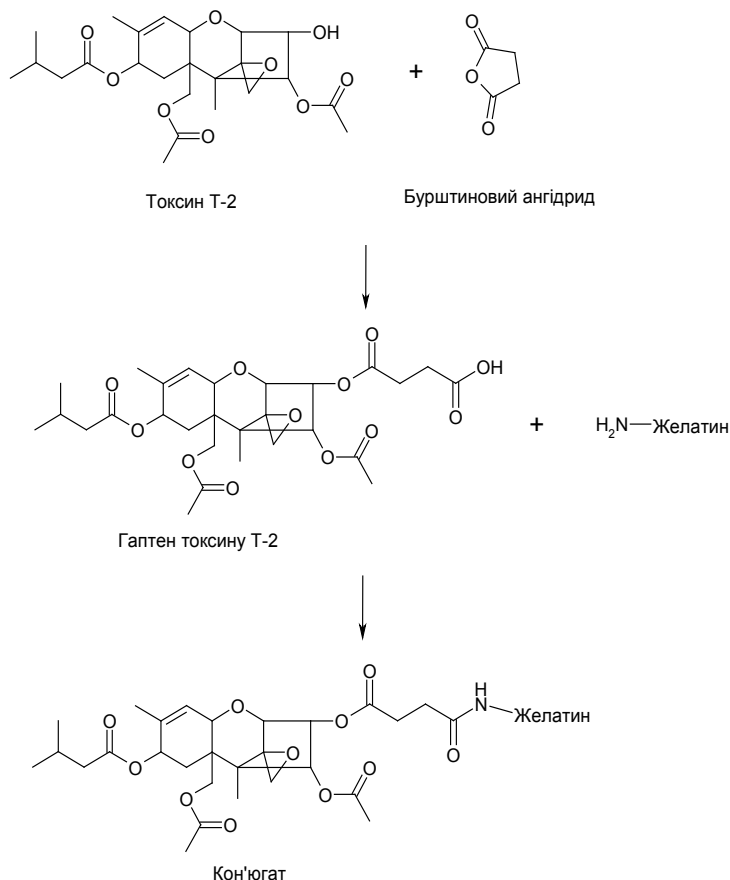


Рис. 1. Схема синтезу кон'югату Т-2-токсин – желатина

Для отримання активованого Т-2 токсину синтезували ангідрид бурштинової кислоти з температурою плавлення 118–119 °С (згідно довідника 119,6 °С). Для синтезу гаптену 46,6 мг (0,1 ммоль) Т-2 токсину розчиняли в 1 мл піридину, додавали 500 мг (5 ммоль) бурштинового ангідриду (50-кратний надлишок) і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 2 годин. Розчин набув бурого кольору. Піридин випаровували у вакуумі, а залишок очищали шляхом перекристалізації. При цьому було виділено 15,9 мг кристалічної речовини з температурою плавлення 114,5–116 °С і 32,5 мг в'язкої речовини. Вихідний Т-2 токсин має температуру плавлення 147–147,5 °С. На жаль, в літературі [6, 12] немає даних щодо агрегатного стану активованого Т-2 токсину. Для відпрацювання оптимальних умов його синтезу повторили синтез без нагрівання реагентів, аналогічно роботі [12]. Виділений при цьому продукт також мав вигляд в'язкої маси. Втретє 46,6 мг Т-2 токсину і 30 мг бурштинового ангідриду розчиняли в 0,5 мл висушеного і перегнаного піридину, витримували за кімнатної температури 48 годин, потім нагрівали на киплячій водяній бані протягом 2 годин. Піридин випаровували у вакуумі (температура бані 50–60 °С), залишок обробляли 1 мл 2н розчину сірчаної кислоти, екстрагували ефіром. Ефірний екстракт промивали дистильованою водою, ефір випарували у вакуумі во-

дотруменевого насосу при нагріванні на водяній бані. В залишку одержали 45 мг речовини у вигляді прозорої жовтуватої плівки в'язкої консистенції.

Одержані продукти синтезу проаналізували методом тонкошарової хроматографії. Для хроматографії використовували пластинки „Сорбфіл” без активації, система розчинників – хлороформ-метанол (10:1), проявник – 20 % розчин сірчаної кислоти в метанолі з наступним нагріванням в сушильній шафі до 125 °С. На пластинку наносили 50 мкг досліджуваної в'язкої речовини в розчині хлороформу або метанолу. Проведені дослідження показали, що вихідний Т-2 токсин із значенням R_f 0,80–0,81 та активований Т-2 токсин з R_f 0,23–0,24 присутні у в'язкій речовині першого і третього синтезу, причому більший вміст останнього одержано в третьому синтезі. В другому синтезі, проведеному без нагріву реагентів по методу [11], ідентифіковано тільки вихідний Т-2 токсин, активований Т-2 токсин відсутній. Одержані результати дають підставу зробити висновок, що за кімнатної температури, без нагрівання Т-2 токсин не реагує з бурштиновим ангідридом, тому для одержання активованого Т-2 токсину реакційну суміш обов'язково необхідно нагрівати на киплячій водяній бані. При цьому, щоб досягти більшого переходу Т-2 токсину в активований Т-2 токсин, термін нагрівання повинен бути більше двох годин.

5. 2. Синтез кон'югату Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном

Одержаний в третьому синтезі активований Т-2 токсин використаний для повторного синтезу кон'югату Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном.

Для одержання кон'югату Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном 35,3 мг бичачого сироваткового альбуміну розчиняли в 10 мл води. Розчин прозорий з рН 7,5. До розчину 5,7 мг активованого Т-2 токсину в 1 мл тетрагідрофурану додали 4,2 мг водорозчинного карбодііміду, перемішували одну хвилину і додавали до розчину бичачого сироваткового альбуміну при перемішуванні на магнітному змішувачі. Величина рН розчину знизилася до 3,1. Продовжували перемішування. Протягом 7 годин ще двічі додавали 4,8 мг та 4,7 мг карбодііміду. Реакційну суміш очищали від низькомолекулярних сполук шляхом діалізу проти 2 л дистильованої води 48 годин в холодильнику. Міняли дистильовану воду і продовжували діаліз ще 24 години. Після діалізу розчин з осадом центрифугували, одержаний розчин і осад окремо ліофільно висушували. З розчину одержали 18,3 мг кон'югату у вигляді сніжно-білої пористої маси, з осаду – 24,6 мг порошок з кремовим відтінком.

Воду від першого діалізу екстрагували хлороформом 4 рази по 10 мл. Хлороформні екстракти випаровували, залишок досліджували методом тонкошарової хроматографії. На хроматограмі чітко проявляється пляма вихідного Т-2 токсину, а на рівні активованого Т-2 токсину ледве помітна смужка. Маючи на увазі, що одержаний кон'югат виявився нерозчинним у воді і в

суміші хлороформ-метанол, це може свідчити про те, що практично увесь активований Т-2 токсин зв'язався з бичачим сироватковим альбуміном.

Відносно співвідношення Т-2 токсину : бичачий сироватковий альбумін можна зробити наступний висновок: судячи по тонкошарових хроматограмах, орієнтовно 30 % в синтезованому активovanому Т-2 токсині складає вихідний Т-2 токсин. Для синтезу взяли співвідношення активovanого Т-2 токсину до бичачого сироваткового альбуміну з розрахунку 20 молекул на 1 молекулу альбуміну. Враховуючи той факт, що за даними хроматографії практично увесь активований Т-2 токсин зв'язався з бичачим сироватковим альбуміном, можна зробити висновок, що співвідношення Т-2 токсину – бичачого сироваткового альбуміну повинно бути не менше, ніж 10:1.

5. 3. Одержання кон'югату Т-2 токсину з овальбуміном

Наступними дослідженнями було встановлено, що при молярному співвідношенні активований Т-2 токсин : овальбумін 7,3:1 в процесі реакції овальбумін виділився в осад майже повністю. 46,6 мг овальбуміну розчиняли в 10 мл дистильованої води, рН розчину 5,3. 4,1 мг гаптену токсину Т-2 розчиняли в 1 мл тетрагідрофурану, додавали 6,1 мг водорозчинного карбодіміду. Розчин перемішували 1 хвилину і виливали в розчин овальбуміну, перемішуючи на магнітному змішувачі. Величина рН розчину знижується до 3,08, додаванням 1 М розчину гідроокису натрію рН підвищували до 4,0. Ще двічі додавали по 4,1 мг водорозчинного карбодіміду, перемішували і залишали в холодильнику. Наступного дня додавали 1 М розчин гідроокису натрію до рН 5,6, перемішували 5 годин. Доводили величину рН до 7,8 і мутний розчин переносили на целофан для діалізу проти 2 л дистильованої води, після чого залишали в холодильнику на 72 години. Замінювали дистильовану воду і продовжували діаліз ще 48 годин. Розчин після діалізу піддавали центрифугуванню, після чого прозорий розчин над осадом зливали, осад промивали 1 мл дистильованої води, центрифугували і воду приєднували до попереднього надосадового розчину. Осад і надосадовий розчин окремо заморожували і ліофільно висушували. Із взятого для синтезу 46,6 мг овальбуміну одержано 42,6 мг кон'югату у вигляді осаду з водного розчину. В розчині після його ліофільного висушування залишку практично не було.

Слід відмітити, що в зарубіжних публікаціях не вказується, що кон'югат активovanого Т-2 з БСА або з ОВ малорозчинний у воді і виділяється в осад [6, 7, 13]. На думку авторів статті, по мірі приєднання активovanого Т-2 до протеїнової молекули остання втрачає гідрофільні властивості, внаслідок чого розчинність кон'югату у воді зменшується і він виділяється з водного розчину у вигляді осаду. З цього припущення можна зробити висновок, що, зменшивши молярне співвідношення Т-2 токсин-овальбумін, кон'югат може залишитись розчинним у воді. Тому вирішили повторити синтез кон'югату, зменшивши молярне співвідношення активovanий Т-2 токсин:овальбумін до 2:1. В результаті синтезу з 46,5 мг овальбуміну у водному розчині залишку практично не було, а у вигляді осаду одержано 41,7 мг кон'югату. Таким чином, зменшенням

молярного співвідношення активovanий Т-2 токсин – овальбумін не вдалося одержати кон'югат, розчинний у воді.

5. 4. Одержання кон'югату Т-2 токсину з гемоціаніном

Враховуючи невдачі із синтезом водорозчинного кон'югату з овальбуміном, вирішили синтезувати кон'югат з гемоціаніном, який має значно більшу молекулярну масу, ніж овальбумін і кон'югати з ним є найбільш імуногенними для ссавців. Для розрахунку молярних співвідношень реагентів виходили з того, що молекулярна маса однієї субодиниці гемоціаніну складає 37400 [14]. Синтез провели з розрахунку 5 молекул гаптену Т-2 на субодиницю гемоціаніну. 37,1 мг гемоціаніну розчиняли в 10 мл води, рН розчину 8,0. 2,8 мг гаптену Т-2 токсину розчиняли в 1 мл тетрагідрофурану, додавали 2,1 мг водорозчинного карбодіміду, перемішували 1 хвилину і додавали в розчин гемоціаніну. Величина рН розчину знижується до 3,15. Перемішуючи магнітним змішувачем, додавали 1 М розчин гідроокису натрію до рН 4,0. На протязі 7 годин іще двічі додавали по 2,1 мг водорозчинного карбодіміду, доводили рН розчину до 5,45. Розчин залишали до наступного дня в холодильнику. Продовжували перемішувати іще 5 годин, доводили рН до 7,2, і мутний розчин переносили на мембрану для діалізу проти 2 л дистильованої води. Залишали в холодильнику на 72 години. Міняли дистильовану воду і продовжували діаліз 48 годин. Розчин з осадом переносили в центрифужну пробірку та центрифугували при 3000 об/хв. Надосадовий розчин зливали. Осад промивали 1 мл дистильованої води, потім центрифугували і розчин приєднували до надосадової рідини. Осад і розчин окремо заморожували і ліофільно висушували. В розчині після висушування залишку практично немає, у вигляді осаду одержано 31,5 мг кон'югату гемоціаніну з гаптенем Т-2 токсину. Таким чином, молекула гемоціаніну при зв'язуванні з Т-2 токсином втрачає розчинність у воді і випадає в осад.

5. 5. Одержання кон'югату Т-2 токсину з желатиною

Для подальших досліджень вирішено було синтезувати кон'югат мікотоксину Т-2 з желатиною (20:1). Враховуючи те, що желатина складається з тропоколагенових ланцюгів, за основу взяли масу ланцюга орієнтовно 300000. Крім того, розрахунок реагентів – желатини і гаптену Т-2 токсину – проводили на основі даних роботи [7], де вказано, що 5 мкг желатини відповідає 0,03 мкмоль. Звідси розрахункова молекулярна маса желатини складає 176000000. Для першого синтезу скористалися розрахунком, виходячи з цієї молекулярної маси. Для одержання кон'югату 35,4 мг желатини розчиняли в 10 мл води при нагріванні на водяній бані до 50 °С, додавали 2,2 мг активovanого Т-2 токсину і 2,1 мг водорозчинного карбодіміду, перемішували на магнітному змішувачі. Доводили рН розчину до 4,05, а потім до 5,85, додавали дві порції водорозчинного карбодіміду (1,8 мг і 2,3 мг), продовжували перемішування протягом двох годин. Продукт реакції очищали діалізом проти 2 л дистильованої води 48 годин за 4 °С, міняли воду і продовжували діаліз протягом 48 годин.

Очищений прозорий розчин ліофільно висушували у вакуумі. Одержано 32,7 мг кон'югату у вигляді сніжно-білої легкої пористої маси.

Таким чином, кон'югат Т-2 токсин-желатина виявився найбільш розчинним у воді, тому його використали для адсорбції на твердій фазі при постановці імунохімічних аналізів. Кон'югат Т-2 токсин – бичачий сироватковий альбумін застосували при імунізації тварин.

5. 6. Отримання поліклональних антитіл до Т-2 токсину

Отримання антисироваток до Т-2 токсину, виділення з них Ig G та тестування імуноензимним та імуносенсорним методами детально описані нами раніше [15]. Експерименти по імунізації тварин (кролів) було проведено нами згідно європейського та українського законодавства та у відповідності з вимогами біоетики.

В ході роботи для первинної оцінки титру антитіл використовували метод подвійної радіальної імунодифузії. Найвищий титр антитіл, який вдалося досягти, становив 1:128 (на рис. 1 не представлено).

Надалі для визначення титру антитіл застосували більш чутливі методи. Методом конкурентного імуноензимного аналізу (ELISA) було встановлено [12], що сироватки крові, отримані при імунізації кролів кон'югатом Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном з титром антитіл 1:9600 дозволяють досягти межі виявлення Т-2 на рівні 10 нг/мл. Імуносенсорний аналіз дозволяє визначати Т-2 токсин в розчинах у лінійному діапазоні концентрацій від 1 нг/мл до 1000 нг/мл.

Було показано також, що отримані авторами статті специфічні до Т-2 токсину антитіла не поступаються моноклональним антитілам (титр поліклональних антитіл – 1:5000; моноклональних (Sigma-Aldrich (США); – 1:10000), забезпечуючи однакову чутливість біосенсорного аналізу при визначенні концентрації Т-2 токсину.

Слід відмітити, що тривалість тестування однієї антисироватки імуносенсорним методом становила 15 хвилин, що є позитивом для проведення окремих аналізів. У випадку одночасного тестування великої кількості дослідного матеріалу зручніше використовувати імуноензимний аналіз.

6. Обговорення результатів дослідження активованого Т-2 токсину з бурштиновим ангідридом та кон'югатів Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном, гемоціаніном та желатиною

Для отримання вітчизняних тест-систем імуносенсорного контролю мікотоксину Т-2 у кормах та в продуктах харчування розроблено детальну методику синтезу імуногенних кон'югатів цього токсину з різними протеїновими носіями. На відміну від існуючих в літературі схематичних вказівок щодо отримання кон'югату Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, приведено детальні умови здійснення синтезу

кон'югатів не тільки з останнім, але й з овальбуміном, гемоціаніном та з желатиною. Всі методики синтезу описані достатньо детально і можуть бути повторені.

Отримані кон'югати, в залежності від типу протеїнів, можна використовувати для різних біохімічних цілей. Так, синтезовані кон'югати Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном та з желатиною і специфічні до цього токсину поліклональні антитіла, можуть бути використані в якості компонентів вітчизняних біосенсорних імунодіагностичних тест-систем.

Запропоновані авторами статті нові імуносенсорні методи не поступаються по чутливості імуноферментним методам аналізу і дозволяють визначати вміст Т-2 токсину в ряді продуктів харчування та у кормах в межах концентрацій від 1 до 500 нг/г. Отримані дані є початковим етапом застосування імуносенсорного аналізу для простого та чутливого визначення Т-2 токсину в об'єктах довкілля, що є важливим у світли вступу України у ВТО, де індикації мікотоксинів приділяється особлива увага. Тому вдосконалення існуючих та розробка нових вітчизняних тест-систем і методик визначення мікотоксину Т-2 є суттєвим кроком у вирішенні проблеми для ветеринарної та медичної науки і практики.

7. Висновки

В результаті проведених досліджень:

1. За допомогою реакції з бурштиновим ангідридом відпрацьовано оптимальні умови для утворення складноефірного зв'язку вихідного Т-2 токсину з проміжним етиленовим ланцюжком альдегіду. При цьому ангідрид бурштинової кислоти реагував з гідроксильною групою Т-2 токсину з утворенням складного ефіру, а друга карбоксильна група залишалася вільною і була використана для приєднання модифікованого Т-2 токсину до молекули протеїну.

2. Активованій таким чином Т-2 токсин (гаптен) ковалентно з'єднувався з аміногрупами протеїнів (за допомогою водорозчинного карбодіміду), утворюючи амідний зв'язок. В результаті проведених досліджень синтезовані кон'югати Т-2 токсину з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном і гемоціаніном, на відміну від кон'югату Т-2 токсину з желатиною, виявилися нерозчинними у воді.

3. Методом тонкошарової хроматографії, на основі чітких плям на хроматограмах, підтверджена наявність активованого Т-2 токсину та кон'югату Т-2 токсину – бичачий сироватковий альбумін. Тонкошарова хроматографія продуктів реакції Т-2 токсину з бурштиновим альдегідом проведена у порівнянні із стандартним розчином Т-2 токсину, який має R_f 0,80–0,81. Ідентифікація однозначна. Щодо в'язкої речовини з R_f 0,23–0,24, то логічно припустити, що це є гаптен токсину Т-2. Підтвердженням правильності цього припущення є факт отримання кон'югатів з бичачим сироватковим альбуміном, овальбуміном, гемоціаніном, желатиною, імунізація кон'югатом кролів та одержання антитіл до Т-2 токсину.

Література

1. Venkataramana, M. Mycotoxins Relevant to Biowarfare and Their Detection [Text] / M. Venkataramana, S. Chandranayaka, H. S. Prakash, S. R. Niranjana // Biological Toxins and Bioterrorism. – 2014. – Vol. 1. – P. 295–319. doi: 10.1007/978-94-007-5869-8_32

2. Фисинин, В. Иммунитет в современном животноводстве и птицеводстве: от теории к практике иммуномодуляции [Текст] / В. Фисинин, П. Сурай // Птицеводство. – 2013. – № 5. – С. 4–10.
3. Zaki, M. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management [Text] / M. Zaki, S. A. El-Midany, H. M. Shaheen, L. Rizzy // Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences. – 2012. – Vol. 4, Issue 1. – P. 13–28. doi: 10.5897/jtehs11.072
4. Розмір плати за послуги, які надаються регіональними службами державного ветеринарно-санітарного контролю та нагляду на державному кордоні та транспорті і установами, що належать до сфери управління Державної ветеринарної та фітосанітарної служби, з питань ветеринарної медицини [Текст]. – Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України 31.10.2012, № 666.
5. Котик, А. М. Методичні рекомендації щодо якісного та кількісного визначення Т-2 і НТ-2 токсинів у зерні та комбікормах [Текст] / А. М. Котик, В. О. Труфанова, О. В. Труфанов, Ю. М. Новожицька. – Затверджено Державним департаментом ветеринарної медицини МінАП України 30.12.2005, № 125.
6. Chu, F. S. Production of antibody against T-2 toxin [Text] / F. S. Chu, S. Grossman, C. Mirocha // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – Vol. 73, Issue 1. – P. 104–108.
7. Кононенко, Г. П. Иммуноферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне [Текст] / Г. П. Кононенко, А. А. Буркин, Н. А. Соболева // Прикл. биохим. и микробиол. – 1999. – Т. 35, № 4. – С. 457–462.
8. Li, Y. High Specific Monoclonal Antibody Production and Development of an ELISA Method for Monitoring T-2 Toxin in Rice [Text] / Y. Li, X. Luo, S. Yang, X. Cao, Z. Wang, W. Shi, S. Zhang // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62, Issue 7. – P. 1492–1497. doi: 10.1021/jf404818r
9. Коваленко, Л. В. Розробка методик одержання компонентів для виявлення Т-2 токсину в кормах з використанням ІФА [Текст] / Л. В. Коваленко, С. А. Михайлова, О. П. Руденко, В. С. Бойко, Л. В. Матюша, О. М. Попова // Ветеринарна медицина. – 2014. – Вип. 98. – С. 161–165.
10. Гойстер, О. С. Застосування сучасних біосенсорних технологій в екотоксикологічному моніторингу деяких токсикантів природного (мікотоксини) та антропогенного (пестициди) походження. Частина 1. Мікотоксини (Огляд) [Текст] / О. С. Гойстер, С. В. Дзядевич, О. Г. Мінченко // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2013. – Т. 10, № 3. – С. 55–75.
11. Bailey, G. S. The production of antisera [Text] / G. S. Bailey // Proteins. Methods in Molecular Biology. – 1987. – Vol. 1. – P. 295–300. doi: 10.1385/0-89603-062-8:295
12. Ligler, F. S. A homogeneous immunoassay for the mycotoxin T-2 utilizing liposomes, monoclonal antibodies, and complement [Text] / F. S. Ligler, R. Bredehorst, A. Talebian, L. C. Shriver, C. F. Hammer, J. P. Sheridan et. al. // Analytical Biochemistry. – 1987. – Vol. 163, Issue 2. – P. 369–375. doi: 10.1016/0003-2697(87)90237-5
13. Swanson, S. P. Preparation and characterization of the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol, and deepoxy scirpentriol [Text] / S. P. Swanson, H. D. Rood, J. C. Behrens, P. E. Sanders // Appl. Environ. microbiol. – 1987. – Vol. 53, Issue 12. – P. 2821–2826.
14. Эйхгорн, Г. Неорганическая биохимия. Т. I [Текст] / Г. Эйхгорн, – М.: Изд-во «Мир». 1978. – 711 с.
15. Гойстер, О. С. Визначення Т-2 токсину за допомогою імуноензимного та імуносенсорного методів [Текст] / О. С. Гойстер, В. Є. Кривенчук, Г. О. Хмельницький, О. Г. Мінченко // Біотехнологія. – 2013. – Т. 6, № 5. – С. 87–93. doi: 10.15407/biotech6.05.087